

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA  
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE, NATURALI  
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE  
INDIRIZZO FISIO-PATOLOGICO

TESI DI LAUREA

**“EFFETTI DELLA MODULAZIONE IN VIVO DEL PROCESSO DI  
AUTOFAGIA SULL’ACCUMULO ETÀ-DIPENDENTE DI  
MITOCONDRI DANNEGGIATI DALLO STRESS OSSIDATIVO”**

CANDIDATO

Mery Brunini

RELATORE

Chiar.<sup>mo</sup> Prof. E. Bergamini

Dott. A. Donati

ANNO ACCADEMICO 2005/2006

*A tutti coloro che in questi anni  
mi hanno sostenuto e guidato*

## Riassunto

L'autofagia è un processo cellulare che consiste nella degradazione per via lisosomiale di macromolecole, organuli e membrane. Con l'aumento dell'età si osserva sia un progressivo declino di queste funzioni che un accumulo di mitocondri alterati che potrebbero causare un incremento dello stress ossidativo durante l'invecchiamento. Scopo di questa ricerca è stato valutare il ruolo dell'autofagia nella rimozione dei mitocondri alterati dapprima intensificando il processo in animali adulti quando il danno mitocondriale è già evidente e poi inibendolo in animali giovani.

Inizialmente, utilizzando ratti maschi albinici di ceppo Sprague-Dawley di 3 mesi di età, si è provveduto a validare un modello di induzione in vivo dell'autofagia mediante somministrazione di farmaci antilipolitici. Successivamente sono stati utilizzati ratti maschi di 3 e 16 mesi d'età alimentati ad libitum. Gli animali adulti sono stati messi a digiuno e dopo 18 ore è stato loro somministrato l'antilipolitico 5-dimetil pirazolo (12mg/Kg p.c.), al fine di intensificare il processo di autofagia, per due volte a distanza di 3 ore. Gli animali giovani sono stati sottoposti o ad un periodo di digiuno di 24 ore o ad alimentazione libera e somministrazione d'insulina a lento rilascio per inibire il processo di autofagia. Il fegato è stato prelevato sotto anestesia con pentobarbital (50mg/Kg p.c.), omogenizzato e utilizzato per il dosaggio della citocromo C ossidasi e per l'estrazione delle singole basi del DNA mitocondriale (mtDNA). I livelli della

base ossidata 8-idrossi-2deossiguanosina (8OHdG) sono stati valutati mediante dosaggio HPLC con rivelatore elettrochimico.

Negli animali adulti l'intensificazione farmacologica dell'autofagia per 6 ore riporta i livelli di 8OHdG nel mtDNA ai livelli presenti nel ratto di 3 mesi di età senza ridurre i livelli totali di citocromo C ossidasi, utilizzata come marcatore mitocondriale. La somministrazione di insulina determina incrementi tra loro paralleli del contenuto di 8OHdG e di citocromo C ossidasi.

I risultati sono compatibili con l'ipotesi che l'autofagia abbia un ruolo nella rimozione selettiva di pochi mitocondri danneggiati e che il declino della funzione possa portare ad un aumento del contenuto di mitocondri alterati e la stimolazione dell'autofagia possa ovviare a questa alterazione. Dato che l'autofagia declina con l'aumento dell'età, questi risultati depongono a favore dell'ipotesi che l'accumulo di mitocondri alterati nelle cellule senescenti sia secondario alla compromissione della funzione autofagica.

## Abstract

The autophagy is a cellular process that consist in the degradation, by a lysosomal pathway, of macromolecule, organelles and membranes. With increasing age it is observed a progressive decline of this function and an accumulation of altered mitochondria probably causing an increase of oxidative stress during aging. In this research we assessed the role of the autophagy in the removal of the altered mitochondria, by intensification of the process in adult animals when the mitochondrial damage is bigger and then by its inhibition in young animals. Initially, male albino Sprague-Dawley rats of 3 months of age were used, in order to validate a model of in vivo induction of autophagy by the administration of antilypolitic drugs. Subsequently male rats of 3 and 16 months of age fed ad libitum were used. In order to intensify the autophagic process we administered the antilypolitic 5-dimethylpirazole (12 mg/Kg b.w.) to the adult animals twice after 18 and 21 hours of fasting. The young animals were submitted to a 24 hour fasting period or to ad libitum feeding and slow release insulin administration in order to inhibit the autophagic process. The liver was taken under anaesthesia with pentobarbital (50mg/Kg p.c.), homogenized and used for the dosage of cytochrome C oxidase and for the extraction of the single bases of the mitochondrial DNA (mtDNA). The levels of the oxidized base 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8OHdG) have been estimated by HPLC assay with electrochemical detector. In the adult animals the pharmacological intensification of autophagy for 6 hours tunes back the levels of 8OHdG in the mtDNA to juvenile levels (3 months) without reduction of the total levels of cytochrome C oxidase, used as mitochondrial marker. The

insulin administration increases in a similar way the 8OHdG content and the cytochrome C oxidase activity. The results are compatible with the hypothesis that autophagy has a role in the selective removal of few damaged mitochondria and that the decline of the function may be responsible for an increase of altered mitochondrias; the autophagy stimulation is able to prevent this alteration. Since autophagy declines with increasing age, these results suggest that the accumulation of altered mitochondrias in the aged cells is secondary to the impairment of autophagic function.